

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РАКОВОГО МАРКЕРА МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ (CA15-3)

### 200-10, CanAg CA15-3 EIA

Каталог. №: 200-10

Методика від 10-2014

Кількість : 96

Виробник : Fujirebio Diagnostics, Inc.,  
(Швеція)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадат.

#### ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Набір CanAg CA15-3 EIA призначений для кількісного визначення асоційованого з раком антигена MUC-1 (CA15-3) в сироватці крові людини.

**ВСТУП І ПОЯСНЕННЯ МЕТОДУ** (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

#### ПРИНЦИП МЕТОДУ

Справжній набір є твердофазовим, неконкурентним методом, заснованим на прямій техніці "сендвіч". Калібратори, контролю та сироватки пацієнтів інкубуються разом з біотинильованими анти-CA15-3 моноклональними антитілами і моноклональними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (HRP) в покритих стрептавідином лунках мікропланшетів. Після промивання в кожну лунку додається буферний реагент субстрат/хромоген (перекис водню і 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин), в результаті відбувається ферментативна реакція. У процесі реакції в присутності антигену розвивається блакитне забарвлення. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену CA15-3, присутньому у зразку. Інтенсивність забарвлення вимірюється на мікропланшетному рідері при 620 нм (або, що не обов'язково, при 405 нм після додавання стоп-розчину). Стандартні криві будуються для кожного аналізу в координатах оптична щільність проти концентрації для кожного стандарту. Концентрація CA15-3 в зразках пацієнта розраховується з калібрувальної кривої.

#### РЕАГЕНТИ

- Кожен набір містить реагенти для 96 тестів.
- Термін придатності набору проставлений назовні коробки.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте реагенти з різних лотів і наборів.
- Зберігайте набір при 2-8 °C. Не заморожуйте.
- Стабільність розкритих реагентів наведена в таблиці нижче, за умови, що вони не були контаміновані, зберігалися в ретельно закритих оригінальних упаковках і зберігаються і використовуються, як описано. негайно повертайте реагенти в холодильник (2-8 °C) після використання.

Компонент	Кількість	Зберігання і стабільність після першого використання
Мікропланшет	1 планшет	2-8 °C до закінчення терміну придатності
12x8 мікролунок, покритих стрептавідином. Після розкриття негайно поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет з осушувачем і ретельно запечатайте пакет, зберігайте сухим.		
Калібратори CA15-3	5 флаконів х 0.75 мл, 0-15-50-125-250	2-8 °C до закінчення терміну придатності
Антиген MUC-1 в Трис-HCl буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін, інертний жовтий барвник і 0,01% Methylisothiazolinone (MIT) як консервант. Готовий до використання.		
Контролі CA15-3	2 флакона х 0.75 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності

Антиген MUC-1 в Трис-HCl буферному сольовому розчині, що містить бичачий сироватковий альбумін і 0,01% Methylisothiazolinone (MIT) як консервант. Готовий до використання.

Біотин Анти-CA15-3	1 флакон х 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
--------------------	------------------	--

Біотин Анти-CA15-3 моноклональне мишаче антитіло, ~ 2.5 мкг/мл. Містить буферний сольовий розчин (pH 7.2), бичачий сироватковий альбумін, бичачий імуноглобулін, блокуючі агенти, детергенти, інертний синій барвник і 0.01% метилізоціазолін (MIT) в якості консерванту. Має бути змішаний з Трейсер, HRP Анти-CA15-3 перед використанням.

Трейсер, HRP Анти-CA15-3	1 флакон х 0.75 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
--------------------------	--------------------	--

Сток-розчин кон'югату пероксидази хрому з анти-CA15-3 моноклональними мишачими антитілами, ~ 50 мкг/мл. Містить консерванти. Повинен бути перед використанням змішаний з Біотином Анти-CA15-3.

Розчинник зразків	2 х 50 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------------	-----------	--

Готовий до використання розчин, що містить Трис-HCl забуферений сольовий розчин з бичачим сироватковим альбуміном, інертним жовтим барвником і 0.01% MIT як консервант.

Додатковий Розчинник зразків може бути замовлений: "Розчинник зразків CA15-3 EIA", номер продукту № 200-24, містить 50 мл.

Субстрат ТМБ-HRP	1 флакон х 12 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
------------------	------------------	--

Містить забуферений розчин перекису водню і 3,3', 5,5' Тетраметилбензидин (ТМБ). Готовий до використання.

Стоп-розчин	1 флакон х 15 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
-------------	------------------	--

Містить 0.12 M соляної кислоти. Готовий до використання.

Концентрат промивального буфера	1 флакон х 50 мл	2-8 °C до закінчення терміну придатності, вказаного на флаконі
---------------------------------	------------------	--

Містить TPIC-HCl сольовий розчин з TBH 20 і Germall II як консервант. Повинен бути розведений перед використанням в 25 разів водою.

#### Ознаки нестабільності

Розчин субстрату ТМБ повинен бути безбарвний або злегка блакитний. Блакитний колір свідчить про забруднення реагенту і розчин повинен бути викинутий.

#### ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

##### Для використання в in-Vitro діагностиці

- Тільки для професійного використання
- Будь ласка, зверніться до публікації Департамент охорони здоров'я та соціальних служб США (Bethesda, штат Меріленд, США) публікація № (CDC) 88-8395 щодо лабораторної безпеки або будь-якого іншого місцевого або національного регулювання.
- Поводитися зі зразками пацієнтів як з потенційно інфекційними.
- Дотримуйтесь місцевих керівних принципів при утилізації всіх відходів.

#### Увага

Матеріали людського походження, використані при виробництві реагентів даного набору, були протестовані з негативними результатами на антитіла до ВІЛ 1 та 2, антитіла до ВГС і поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg). Оскільки не існує методу, який повністю гарантує відсутність інфекційних захворювань, що передаються з кров'ю, то з усіма матеріалами людського походження необхідно поводитися як з потенційно інфекційно небезпечними.

#### ЗБІР І РОБОТА ЗІ ЗРАЗКАМИ

CanAg CA15-3 EIA призначений для використання з сироваткою. Проведіть забір крові з вени і відокремте сироватку відповідно до звичайних процедур. Зразки можуть зберігатися при температурі 2-8 °C протягом 24 годин. Для більш довгих періодів зберігати при -70 °C або нижче. Трубки, що містять гель, не повинні використовуватися для довгострокового зберігання. Зразки не повинні зберігатися в холодильній камері, яка сама заморожується. Дозволити замороженим зразкам танути повільно, переважно при температурі 2-8 °C протягом ночі, а потім привести зразки до кімнатної температури перед аналізом.

## ПРОЦЕДУРА

### Необхідні матеріали, що не поставляються з набором

#### 1. Мікропланшетний шейкер

Поздовжній шейкер повинен давати близько 200 рухів на хвилину, орбітальний - 700-1100/хвилину.

#### 2. Пристрій для промивання мікропланшета

Автоматичний промивальний пристрій з можливістю виконувати 1 і 6 циклів промивання з мінімальним обсягом наповнення 350 мкл/лунку/цикл промивки.

Якщо не використовується автоматичний мікропланшетний вошер, можна застосувати Nunc Імуно-8 вошер.

#### 3. Мікропланшетний Рідер

З довжиною хвилі 620 нм і/або 405 нм і діапазоном абсорбції від 0 до 3.0.

#### 4. Точні піпетки

З одноразовими пластиковими наконечниками для внесення мікрооб'ємів рідин. 8-канальна піпетка для внесення 100 мкл бажана, але не обов'язкова. Піпетки для дозування обсягів в мікролітрах.

#### 5. Дистильована або деіонізована вода

Для приготування Промивного Розчину.

### Примітки до методики

1. Повне розуміння даної інструкції необхідно для забезпечення належного використання набору CA15-3 EIA. Реагенти, що входять в комплект, призначені для використання як єдиний блок. Не змішуйте ідентичні реагенти з наборів, що мають різні номери партій. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності, вказаного на зовнішній стороні набору.

2. Реагенти необхідно привести до кімнатної температури (20-25 °C) перед використанням. Аналіз варто проводити тільки при температурах між 20-28 °C для отримання точних результатів. Заморожені зразки повинні бути м'яко, але ретельно перемішані обережним перевертанням флаконів після відтавання.

3. Перш ніж приступити до піпетування калібраторів і невідомих зразків, доцільно позначити смужки, щоб мати можливість чітко визначити зразки під час і після аналізу.

4. Вимога ефективної і ретельної промивки для розділення зв'язаного і незв'язаного антигену і реагентів від зв'язаних твердо фазових комплексів антитіло-антиген є одним з найбільш важливих кроків в ІФА. З метою забезпечення ефективного промивання переконайтеся, що всі лунки повністю заповнені до верхнього краю розчином для промивання протягом кожного циклу промивання, що промивний розчин розливають з необхідною швидкістю, що аспірація лунок між і після циклів промивання є повною і, що лунки порожні. Якщо є залишки рідин, інвертувати пластину і постукати нею по фільтрувальному паперу.

- Автоматичний вошер: Дотримуйтесь інструкцій виробника щодо належного очищення та обслуговування і проводьте необхідну кількість циклів промивання до і після кожної стадії інкубації. Рекомендується використовувати режим роботи *смужка* і режим промивки *переповнення* з об'ємом заповнення 800 мкл. Пристрій для аспірації/промивання не слід залишати з Промивним Розчином протягом тривалого часу, так як голки можуть забитися через погане наповнення рідиною і аспірацію.

5. Субстрат ТМВ-HRP є дуже чутливим до забруднення. Для оптимальної стабільності ТМВ HRP-субстрату, залити необхідну кількість з флакона в ретельно промитий резервуар або одноразовий пластиковий лоток, щоб уникнути забруднення реагенту. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові піпетки (або наконечники).

6. Обов'язково використовуйте чисті одноразові пластикові наконечники піпеток і правильну точну техніку піпетування при роботі із зразками і реагентами. Не допускайте торкання піпеткою поверхні рідини, щоб уникнути перенесення забруднення. Належна техніка піпетування має особливе значення при поводженні зі зразками та розчином ТМВ-субстрату HRP.

Приготування реагентів	Стабільність приготовленого реагенту
Промивний розчин	2 тижні при 2-25 °C в герметичному контейнері
Налийте 50 мл промивного концентрату в чисту посудину і розбавте в 25 разів додаванням 1200 мл дистильованої або деіонізованої води для отримання буферного розчину для промивання.	
Розчин Антитіл	3 тижні при 2-8 °C в герметичному контейнері
Приготуйте потрібний об'єм Розчину Антитіл змішуванням 50 мкл Трейсера, HRP	

Анти-CA15-3 з 1 мл Біотину Анти-CA15-3 на смужку (див. таблицю нижче):

Кількість смужок	Трејсер, HRP Anti-CA15-3 (мкл)	Біотин Анти-CA15-3 (мл)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Переконайтеся, що використовуються тільки чисті пластикові або скляні посудини для приготування Розчину Антитіл.

**Альтернатива:** Вилийте вміст Трейсера, HRP Anti-CA15-3 у флакон з Біотином Анти-CA15-3 і акуратно перемішайте. Переконайтеся, що Трејсер, HRP Anti-CA15-3 повністю перелитий у флакон з Біотином Анти-CA15-3.

**ПРИМІТКА:** Розчин Антитіл стабільний протягом 3-х тижнів при 2-8 °C. Не готуйте більш Робочого розчину Трейсера, ніж буде використано протягом цього періоду і переконайтеся, що він зберігається належним чином.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Усі стандарти, контролю і зразки повинні аналізуватися в дублях. Калібрувальна крива повинна будуватися при кожній постановці аналізу. Перед використанням реагенти повинні бути приведені до кімнатної температури (20-25 °C).

1. Приготуйте Промивний Розчин і Розчин Антитіл. Дуже важливо використовувати чисті ємності. Чітко дотримуйтесь інструкції.
2. Розвести зразки сироватки 1:41 шляхом змішування 25 мкл зразка з 1 мл Розчинника зразків. **ПРИМІТКА:** Калібратори і Контролі CA15-3 1 і 2 **не** розводити.
3. Закріпіть необхідну кількість мікросмужок в тримачі. (Помістіть невикористовувані смужки в пластиковий пакет з осушувачем і закрийте його). Промийте кожну смужку один раз розчином для промивання. Не промивайте більше смужок, чим збираєтеся використовувати протягом 30 хвилин.
4. Внесіть 25 мкл CA15-3 Калібраторів (CAL 0, 15, 50, 125, 250), контролей (C1, C2) і невідомих зразків (невідомі - Unk) в лунки у відповідності з наступною схемою:

	1	2	3	4	5 і т.д.
A	Кал. 0	Кал. 250	Невід. 2		
B	Кал. 0	Кал. 250	І т.д.		
C	Кал. 15	C1			
D	Кал. 15	C1			
E	Кал. 50	C2			
F	Кал. 50	C2			
G	Кал. 125	Невід. 1			
H	Кал. 125	Невід. 1			

5. Додайте 100 мкл Розчину Антитіл в кожну лунку, використовуючи точну піпетку на 100 мкл (або восьми канальну піпетку на 100 мкл). Уникайте дотику наконечників до поверхні рідини.
6. Інкубуйте пластину протягом 2 годин (± 5 хв.) при кімнатній температурі (20-25 °C) з постійним потрушуванням.
7. Після інкубації аспірувати і промити кожну смужку 6 разів.
8. Додайте 100 мкл субстрату ТМБ в кожну лунку, в тій же послідовності, як в п. 4. Розчин субстрату слід додавати по можливості швидко, щоб час між додаванням в першу і останню лунку не перевищував 5 хвилин.
9. Інкубуйте 30 хвилин (± 5 хвилин) при кімнатній температурі з постійним перемішуванням планшета на шейкері. Уникайте потрапляння прямого сонячного світла.
10. негайно зчитайте оптичну щільність на рідері при 620 нм.

### Варіант

Якщо в лабораторії немає рідера з фільтром на 620 нм, оптична щільність може бути визначена як описано нижче:

Альт. 10. Додайте 100 мкл стоп-реагенту в кожну лунку і перемішайте. Після цього протягом 15 хвилин зчитайте оптичну щільність при 405 нм.

### Діапазон вимірювання

Набір CA15-3 EIA вимірює концентрації між 1 і 250 Од/мл. Якщо концентрація CA15-3 вище діапазону вимірювання, як очікується,

рекомендується розбавляти зразки 1/400 і 1/4000 з Розчинником зразків перед аналізом.

#### Контроль якості

Контролі CA15-3 1 і 2 можуть бути використані для перевірки серії аналізу. Діапазони очікуваних результатів зазначені на етикетках флаконів з реагентами. Якщо значення виходять за межі зазначених діапазонів, необхідно провести повну перевірку реагентів і продуктивності зчитувача і повторити аналіз. Кожна лабораторія може додатково підготувати свої власні пули сироватки на різних рівнях, які можна використати в якості внутрішнього контролю з метою забезпечення точності аналізу.

#### Референсний матеріал

Оскільки не існує референс-матеріалів для антигену MUC-1 (CA 15-3), Стандарти прокалібровані проти внутрішнього референс-стандарту.

#### РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Якщо використовується мікропланшетний спектрофотометр з вбудованою програмою для розрахунку даних, створіть програму, яка використовує концентрацію, зазначену на етикетці кожного з CA15-3 калібраторів.

Для автоматичного розрахунку результатів CA15-3 рекомендується використовувати один з наступних методів:

- Метод кубічної кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 Од/мл.
- Метод згладженої кривої сплайна є підходящим методом. Калібратор 0 слід використовувати як бланк.
- Інтерполяція з оцінкою від точки до точки. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 Од/мл.
- Метод квадратного рівняння кривої є підходящим методом. Калібратор 0 повинен бути включений в кривій зі значенням 0 Од/мл.

**ПРИМІТКА:** 4-параметрична або лінійна регресія не повинні використовуватися.

Для ручної оцінки калібрувальна крива будується відкладенням значень абсорбції (A), отриманих для кожного CA15-3 калібратора проти відповідної концентрації CA15-3 (в Од/мл). Невідомі концентрації CA15-3 потім можуть бути визначені з калібрувальної кривої з використанням середнього значення абсорбції кожного зразка пацієнта.

Якщо зразок (розведений в 1/41) дає значення CA15-3 більше 250 Од/мл, необхідно розбавити його ще додатково в співвідношенні 1/10 або 1/100 Розчинником зразків перед аналізом.

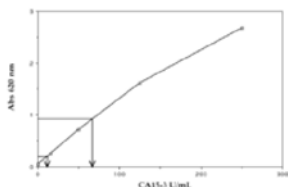
1:10 розбавлення = 50 мкл зразка + 450 мкл Розчинника зразків  
1:100 розбавлення = 50 мкл розведеного 1:10 + 450 мкл Розчинника зразків

Концентрація CA15-3 в нерозбавлених зразках розраховується наступним чином:

Розбавлення 1/10: 10 x Виміряне значення  
Розбавлення 1/100: 100 x Виміряне значення

#### Приклад результатів

Зразок	Значення Калібраторів (Од/мл)	Середнє абс. значення (A)	CA15-3 Од/мл
Калібратор 0	0	0.044	
Калібратор 15	15	0.252	
Калібратор 50	50	0.723	
Калібратор 125	125	1.612	
Калібратор 250	250	2.680	
Зразок А		0.241	14.1
Зразок В		0.895	63.1



Приклад, не використовуйте цю криву для визначення результатів аналізу.

#### ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Рівні CA15-3 не можуть бути використані як абсолютний доказ присутності або відсутності злоякісних пухлин, а набір CA15-3 не повинен використовуватися для скринінгу онкологічних хворих. Результати тестування повинні інтерпретуватися тільки у зв'язку з іншими дослідженнями і методами діагностики захворювань, і CA15-3-тест не повинен заміщати інші клінічні дослідження. Антитіла анти-реагенту (людське антитіло анти-миші (НАМА) або гетерофільні антитіла) у зразку пацієнта можуть іноді заважати аналізу, навіть якщо специфічні блокуючі агенти включені в буфері.

#### ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Нормальні значення: у здорових жінок-донорів (51 жінка) склали 15 Од/мл зі стандартним відхиленням 6.8. Медіана складала 13.8 Од/мл з діапазоном 6-36 Од/мл. Нижня і верхня межі нормального діапазону оцінювалися згідно з рекомендаціями IFCC для непараметричного статистичного аналізу та визначені як 2,5% (нижній) і 97,5% (верхній) квантилі. Референс-інтервал визначений як 95% довірчого інтервалу. N = 51

Фракція	Референсна межа (Од/мл)
2.5-й (нижня)	7
97.5-й (верхня)	36

94% здорових жінок мали значення нижче 30 Од/мл. Рекомендується кожній лабораторії встановити свій власний діапазон нормальних значень з урахуванням локальних факторів навколишнього середовища, таких, як харчування, клімат, умови життя, відбір пацієнтів і т.д.

#### ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### Точність

Точність оцінювалася згідно NCCLS EP5-A з використанням 4 рівнів концентрацій пулованої замороженої сироватки з додаванням людського CA15-3. Кожен зразок був довільно піпетований (n = 2/аналіз) і проаналізований двічі кожен день протягом 20 днів посліпль. Аналіз проводився 40 місяців не менш ніж трьома лаборантами і з використанням 20 різних наборів CapAg CA15-3 Точність показана в таблиці:

Зразок	N	Середня конц. Од/мл	В аналізі SD, Од/мл	В аналізі CV, %	Між днями SD, Од/мл	Між днями CV, %
CA15-3 1	80	15.8	0.55	3.5	1.16	7.3
CA15-3 2	80	57.0	1.73	3.0	6.37	11
CA15-3 3	80	78.6	2.93	3.7	5.29	6.7
CA15-3 4	80	148	4.86	3.3	8.37	5.6

##### Межа виявлення (чутливість)

Межа виявлення для даного набору складала 0.1 Од/мл і визначена як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту плюс 2 стандартних відхилення:

$$\frac{2 \times SD \text{ Калібратора } 0}{OD \text{ Калібратора } 15 - OD \text{ Калібратора } 0} \times 15 \text{ Од/мл}$$

##### Відновлення

Насичені зразки сироватки були приготовлені додаванням аліквоти зразка з сильно підвищеним значенням CA15-3 до нормального зразку сироватки. % відновлення антигену був знайдений в діапазоні 95-110%.

##### Хук-ефект

Хук-ефект не спостерігається для зразків з концентраціями до 7500 Од/мл. **ЗАУВАЖЕННЯ:** в зразках з дуже високою концентрацією колір субстрату змінюється з блакитного на зеленуватий (і навіть жовтий при дуже високих концентраціях). Це призводить до хибно низької оптичної щільності при 620 нм і в екстремальних випадках оптична щільність може падати в межах стандартної кривої, що може бути розцінено як Хук-ефект.

##### Лінійність

Проби пацієнтів були розбавлені Розчинником зразків і проаналізовані. Отримані значення склали 93-102% від очікуваних значень в діапазоні 25-250 Од/мл.

##### Специфічність

Специфічність	Концентрації с незначною інтерференцією (± 10 %)
Ліпемія	10 мг/мл
Білірубін, незв'язаний	0.6 мг/мл
Гемоглобін	5 мг/мл

##### ГАРАНТІЯ

Будь-які зміни або модифікації процедури, не рекомендовані Fujirebio

Діагностика, можуть вплинути на результати, і в цьому випадку Fujirebio Діагностика відмовляється від усіх гарантій, явних, припущених або передбачених законодавством, включаючи гарантії товарного стану та придатності для використання.



**ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР**

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
е-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)